

Protocole n° 20

Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée selon Henriksen et Pohlenz

Principe :

Parmi les nombreuses modifications de la technique de Ziehl-Neelsen, celle proposée par Henriksen et Pohlenz est devenue la méthode de référence pour la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* sur frottis de selles. Elle colore environ 60% des oocystes présents dans un échantillon microscopique. Cette technique est aussi utile à la mise en évidence d'oocystes de *Cyclospora*, coccidie qui peut aussi parasiter l'homme.

Produits nécessaires à la coloration :

Fuchsine de Ziehl Réf. 320490-	0125, 0500, 1000 ou 2500 mL
Vert malachite oxalate Réf. 317880-	0100 g

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Méthanol – Acide sulfurique

Préparation des échantillons :

Les échantillons doivent être préparés conformément aux méthodes en vigueur dans le laboratoire, en l'application de l'Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, J.O. n° 287 du 11 décembre 1999.

Préparation des solutions :

Solution d'acide sulfurique : préparer une solution aqueuse à 2% d'acide sulfurique.

Vert malachite en solution : Préparer une solution aqueuse avec 5 g de Vert malachite oxalate pour 100 mL d'eau distillée

Mode opératoire :

Veillez lire attentivement l'intégralité des informations qui suivent avant d'utiliser le produit.

- Faire un frottis mince de selles.
- Sécher le frottis à l'air.
- Fixer au méthanol pendant 5 minutes
- Sécher le frottis à l'air.
- Colorer dans un bain de Fuchsine de Ziehl pendant 1 heure.
- Rincer à l'eau.
- Décolorer la lame avec la solution d'acide sulfurique, pendant 20 secondes.
- Rincer à l'eau.
- Contre-colorer dans un bain de Vert malachite en solution pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau et laisser sécher le frottis à l'air.

Résultats :

Oocystes de *Cryptosporidium* et de *Cyclospora* : rouge

Fond de la préparation : vert

Les sporozoïtes sont colorés en rouge, le corps résiduel apparaît plus foncé, et il persiste en général une zone plus claire, rose ou incolore, au centre de l'oocyste.

Recommandations et/ou notes d'utilisation :

Produit destiné à un usage unique exclusivement professionnel. Usage de Diagnostic in vitro.

L'enlèvement et le traitement des déchets chimiques et biologiques doivent être effectués par une entreprise spécialisée et agréée.

Température de stockage : 15 – 25 °C.

Références Bibliographiques :

DATRY A., *Diarrhées parasitaires et sida*, L'Information du Technicien Biologiste, vol. 2, 1988, p. 88-90.

HENRIKSEN S.A., POHLENZ J.F.L., *Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique*, *Acta Vet. Scand.*, vol. 22, 1981, p. 594-596.

LECHAT H., BAJOLET O., POIRRIEZ J., THOANNES H., D'ALBIGNAC G., PIGER D. et PINON J.M., *Techniques de coloration des oocystes de Cryptosporidium*, Feuilles de biologie, vol. 28, n° 158, 1987, p. 35-38.